

論文内容の要旨

論文提出者氏名 平本 秀一

論文題目

miR-509-5p and miR-1243 increase the sensitivity to gemcitabine by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer.

論文内容の要旨

がん転移は、予後不良の最たる原因であり、複雑かつ多段階のステップによって成立することが今までの研究から明らかとなってきた。しかし、未だ不明な点が多く残されており、その分子機構の解明はがん治療薬開発における喫緊の課題である。がん転移のステップの一部としてよく知られているのが、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition)で、EMT は、上皮系の細胞が、間葉系形質を獲得する事象であり、間葉系形質を獲得した細胞は移動・浸潤能が亢進し、がん転移を起こしやすいと考えられている。EMT を促進する遺伝子や EMT とは逆方向の間葉系形質から上皮系形質へ誘導する (MET: Mesenchymal Epithelial Transition)遺伝子も、数多く報告されており、その分子機構は徐々に解明されてきている。今回、申請者らは独自に開発したレポーターシステム (EMT 可視化システム)と 1090 種類のマイクロ RNA (miRNA)を搭載した miRNA ライブラリーを組み合わせた大規模 EMT 関連 miRNA スクリーニングを用いて、EMT 抑制性の miRNA を同定することを目的として解析を行った。このレポーターシステムは、上皮系マーカー遺伝子である CDH1 (E-cadherin)のプロモーター領域にプロモーターを持たないベクターに挿入することにより、CDH1 の転写活性依存的に蛍光タンパク質である GFP (Green Fluorescent Protein)が発現するもので、このシステムを用いることにより、EMT 変化を GFP の強度により可視化・定量化することが可能とした。

膵臓がん細胞株 (Panc1)を用いて EMT 可視化システムを構築し、1090 種類の miRNA をそれぞれ形質導入することにより、GFP の蛍光強度を測定した。また、EMT 可視化システムを構築に際しては、スクリーニング精度を向上させるため、2つの独立した細胞を樹立した。miRNA 導入後、細胞増殖を著しく阻害する miRNA は、候補 miRNA から除外した結果、2つの細胞株から共通して得られた EMT 抑制性候補 miRNA は、6つに絞られ、最終的に EMT 抑制性 miRNA として miR-509-5p と miR-1243 を同定した。まず、2つの miRNA を用いて Western blot にて E-cadherin のタンパク発現の上昇と VIM の発現低下を確認した。次に Cell migration/invasion assay で遊走能や浸潤能を確認し、2つの miRNA で抑制されることを確認した。両者の target gene を同定するために、公共データベースである Target Scan 7.1 を用いて探索し、最終的に miR-509-5p は、EMT 促進性遺伝子として知られている HMGA2 や間葉系マーカー遺伝子である vimentin を、miR-1243 は EMT

誘導経路の代表と知られる TGF- β 経路の重要な構成因子である SMAD2, 4 を直接的に翻訳抑制することにより、MET を引き起こすことが考えられた。次に、EMT を起こした細胞は、抗がん剤に耐性を獲得することが知られているため、申請者らはこれら miRNA を細胞に導入した際に抗がん剤 (ゲムシタビン)の効果が上昇するかどうかの検討を行った。その結果、それぞれの miRNA を導入後、ゲムシタビンの腫瘍抑制効果を計測したところ、コントロール群に比べ、miRNA 導入群ではゲムシタビンの効果が増強されることがわかった。このことから、この2つの miRNA は、MET を促進させることにより、抗がん剤の感受性を高める効果があると考えられた。また、ヒト膵臓がん組織中における miR-509-5p の発現について手術検体の FFPE を用いて検討したところ、発現の低い群に比べ発現の高い群では予後が良好であるということがわかった。

EMT 可視化システムと miRNA ライブラリーを組み合わせた大規模スクリーニングによって EMT 抑制性 miRNA である miR-509-5p と miR-1243 を同定することができた。同定した miR-509-5p と miR-1243 のがん組織中での発現を調べることにより、予後のバイオマーカーとしてだけでなく、抗がん剤の効果を予測することができる可能性がある。今後、上記 miRNA を対象とした核酸薬の開発が成されれば、がん組織中において上記 miRNA の発現がない場合においても、抗がん剤との併用治療を行うことにより、腫瘍抑制効果を増強できる可能性が示唆された。